



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
学位記番号	第 1013 号
氏 名	大瀬戸 久美子
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	<p>Mutational analysis of <i>FOXL2</i> p.C134W and expression of bone morphogenetic protein 2 in Japanese patients with granulosa cell tumor of ovary</p> <p>（卵巣顆粒膜細胞腫における <i>FOXL2</i> p.C134W の遺伝子変異解析と BMP2 発現における日本人での検討）</p> <p>Journal of Obstetrics and Gynaecology Research Nov 20 19:41:56 2013</p>
論文審査担当者	<p>主査： 中西 真</p> <p>副査： 高橋 智，杉浦 真弓</p>

論文内容の要旨

【緒言】

FOXL2 は、発育過程のマウスまぶたの間充織と大人の卵胞で選択的に発現されるフォークヘッド転写制御因子をコードしています。

FOXL2 は卵巣の分化で最も初期のマーカーの 1 つです。そして、その表現は成人期に持続します。

FOXL2 は、顆粒膜細胞の正常な発達のために必要とされます。

FOXL2 の生殖細胞系列での機能喪失型変異は BPES と関係しています。

卵巣顆粒膜細胞腫(granulosa cell tumor : GCT)は、卵巣腫瘍取り扱い規約では性索・間質系腫瘍(sex cord-stromal tumor)に分類される境界悪性腫瘍である。本邦においては卵巣腫瘍中の 0.9~1.7%、悪性卵巣腫瘍中の 3.1~8.1%と報告される稀なホルモン産生の卵巣腫瘍である。予後は初期では一般的に良好と考えられているが、顆粒膜細胞腫の 11~18%に術後 10 年以上経過した後の晩期再発も稀ではないとの報告もある。組織像の特徴から成人型と若年型に分類される。成人型(adult granulosa cell tumor : AGCT)は顆粒膜細胞腫の 95%以上を占め、エストロゲン活性を有している。若年型(juvenile granulosa cell tumor)は顆粒膜細胞腫の中で 5%をしめるといわれています。

顆粒膜細胞はエストロゲン、inhibin と Müllerian 抑制物質を分泌する能力があります。

GCT の分子機序が不明なままであるので、重要な臨床的なマーカーが発見されませんでした。

ステージが進んでいる顆粒膜細胞腫または再発した GCT をもつ患者にとって、化学療法の有効性は限られており、より効果的な治療アプローチが必要です。

成人型 GCT の 94-97%で FOXL2 コドン 134 突然変異 (c.402C>G, p. C134W) が起きているという事が、近年の研究で報告されました。

この遺伝子変異は成人型のみで確認されており、また、他の腫瘍組織においては認めない体細胞変異であると報告されています。

この FOXL2 (c.402C>G, p. C134W) の遺伝子変異が日本人においてどの程度認められるかを検討しました。

また、近年のデータでは発育過程の卵巣で発現する follistatin (FST) 遺伝子の制御に FOXL2 と骨形成タンパク質 2 (BMP2) が関連するというデータが示されました。

FST はアクチビンの特定の結合タンパク質で、病態生理学的機能の規制に関与しています。そして、卵巣の顆粒膜細胞の初期の初期の発生と分化に関与します。

FST タンパク質の発現が卵巣がんの 53%で免疫組織化学的に見つけられることを、最近の研究は示唆しました。そして、血清 FST が高い値をがん患者において認めるという報告もあります。

したがって、我々は免疫組織化学的に BMP2 と FST の表現力に関して、FOXL2 p. C134W 突然変異との関連性に関して組織病理学的検討を行いました。

この論文で我々は、卵巣か隆膜細胞腫において、日本の患者での FOXL2 p. C134W 突然変異と inhibin- α 、BMP2 と FST の発現量を検討しました。

【方法】

2009 年から 2012 年の間で名古屋近郊の病院で手術された成人型顆粒膜細胞腫 44 例と若年型顆粒膜細胞腫 2 例、及び上皮性卵巣がん 63 例と胚細胞腫瘍 3 例とその他 2 例において各組織のパラフィンブロックを用い検討を行った。この検討は名古屋市立大学の倫理委員会の承認のもと行

った。パラフィン包埋された組織より DNA を抽出し、成人型顆粒膜細胞腫以外においては FOXL2 exon1 にある c.402C>G の遺伝子変異をダイレクトシーケンスにより解析した。また、成人型顆粒膜細胞腫においてはクローニングを行った後にシーケンス解析を行った。さらに成人型顆粒膜細胞腫及び若年型顆粒膜細胞腫において inhibin- α 、BMP2 及び FST の免疫組織化学により検討を行った。

【結果】

inhibin- α の免疫組織化学により顆粒膜細胞腫であることを確認したサンプルを用い検討した。

この研究において FOXL2 p.C134W の遺伝子変異を成人型顆粒膜細胞腫において 44 例中 27 例に 61.4%において確認しました。しかし、若年型顆粒膜細胞腫においてはこの遺伝子変異は認められませんでした。その他の卵巣腫瘍においてはダイレクトシーケンスにより解析した結果 FOXL2p.C134W 遺伝子変異は認められませんでした。成人型顆粒膜細胞腫 44 例のうち、17 例はパラフィン包埋サンプルから抽出した DNA を用いサブクローニングを行った。PCR 産物を用いて pTA2 Vector を使ってサブクローニングを行った。そして、DNA シーケンサーでの 5' -と 3' -端から、配列決定を行った。

成人型顆粒膜細胞腫以外の卵巣腫瘍（上皮性卵巣がん [n = 63]、胚細胞性腫瘍 [n = 3]、若年型顆粒膜細胞腫 [n = 2] その他 [n = 2]）においても FOXL2p.C134W 遺伝子変異をダイレクトシーケンスにより解析した。

しかし、非顆粒膜細胞腫のサンプルのどれも。また若年型顆粒膜細胞腫においてもダイレクトシーケンスにより遺伝子変異は認められませんでした。

成人型顆粒膜細胞腫と診断された症例の年齢中央値は 52.4 ± 15.7 。非 GCT においては 53.7 ± 12.9 であり、症例間で年齢の差は無かった。成人型顆粒膜細胞腫における遺伝子変異陽性症例では中央値 53.3 ± 15.2 、変異陰性症例では 51.1 ± 16.8 であった。

FOXL2p.C134W 遺伝子変異陽性症例及び変異陰性症例における CA125 においても優位な差は認められませんでした。

これら統計学的解析は Mann-Whitney non-parametric U-検定を用い行いました。

また、成人型顆粒膜細胞腫において BMP2 及び FST の免疫組織化学を行い検討した結果、BMP2 が発現していた症例が 44 例中 14 例で 31.8%、FST においては 1 例も発現は確認されませんでした。FST に関しては 2 例の若年型顆粒膜細胞腫においても FST の発現は確認されませんでした。

【考察】

顆粒膜細胞腫は卵母細胞を覆う卵胞上皮細胞である顆粒膜細胞から発生してくる。

顆粒膜細胞腫はエストロゲンと inhibin を分泌するホルモン活性という点において他の卵巣腫瘍と異なります。我々の成人型顆粒膜細胞腫のサンプルにおいて inhibin の免疫組織化学では全て発現が認められました。顆粒膜細胞腫における FOXL2p.C134W 遺伝子変異は日本人において一般的な変異ではない可能性が考えられます。しかし、成人型顆粒膜細胞腫において近年 94-97% が遺伝子変異を有し、それが一つの特徴であるとの報告もありますが、D'Angelo らの報告で日本人ではない成人型顆粒膜細胞腫で 70%で遺伝子変異が見つかったとの報告もあります。我々の顆粒膜細胞腫における研究で遺伝子変異検出率が報告よりも低かった理由として FFPE のサンプルを用いたことが可能性として考えられます。

このFOXL2p.C134W遺伝子変異が若年型顆粒膜細胞腫や他の卵巣腫瘍において見られないということは成人型顆粒膜細胞腫の発生に関わっている可能性が考えられます。それは発がん性や機能獲得型変異である可能性やある特定の疾患だけに起こるものであるということも推察されます。

今までの報告ほどの遺伝子変異率は確認されなかったが、日本人における成人型顆粒膜細胞腫のFOXL2 p.C134W 遺伝子変異も一般的な遺伝子変異である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

【緒言】

卵巣顆粒膜細胞腫 (granulosa cell tumor : GCT) は、性索・間質系腫瘍に分類される稀な境界悪性腫瘍である。成人型 GCT が 95% 以上を占め、エストロゲン活性を有している。近年、成人型 GCT の 94-97% に *FOXL2* コドン 402 突然変異 (c. 402C>G, p. C134W) が報告された。*FOXL2* は、発育過程のマウスまぶた間組織と大人の卵胞で選択的に発現されるフォークヘッド転写制御因子をコードする。

発育過程の卵巣で発現する follistatin (FST) 遺伝子の制御に *FOXL2* と骨形成タンパク質 2 (BMP2) が関連していると報告されており、卵巣がんの 53% に FST の発現がみられるとの報告もある。本研究では日本人における *FOXL2* p. C134W 突然変異と inhibin- α 、BMP2 と FST の発現を検討した。

【方法】

卵巣腫瘍 114 例 (成人型 GCT 44 例と若年型 GCT 2 例、及び上皮性卵巣がん 63 例と胚細胞腫瘍 3 例とその他 2 例) を対象とした。パラフィン包埋された組織より DNA を抽出し、*FOXL2* exon1 にある c. 402C>G の遺伝子変異をダイレクトシーケンスにより解析した。成人型 GCT 44 例のうち、17 例はダイレクトシーケンスできず、サブクローニングにてシーケンスを行った。また、inhibin- α 、BMP2 及び FST の組織免疫染色を行った。

【結果】

成人型 GCT の 61.4% (27/44) に *FOXL2* c. 402C>G の遺伝子変異を確認した。一方、若年型 GCT および GCT 以外の卵巣腫瘍においては同遺伝子変異を認めなかった。

成人型 GCT においてすべての症例に inhibin- α の発現が認められた。BMP2 は 31.8% (14/44) に発現が認められ、FST は全く発現がみられなかった。若年型 GCT においても FST の発現は確認されなかった。成人型 GCT において変異の有無によって血清 CA125 値、BMP2 の組織免疫染色の違いはみられなかった。

【考察】

同変異は日本人において 61.4% と Caucasian における頻度よりも低かった。この遺伝子変異が若年型 GCT や他の卵巣腫瘍において認められなかったことから、同変異は成人型 GCT の発生に関わっており、発がん性や機能獲得型変異である可能性や特定の疾患にのみ起こるものと推察された。

【審査の内容】

主査の中西から、FoxL2 遺伝子の変異部位はどのような機能ドメインに存在するのか等 9 項目、第一副査の高橋教授から FoxL2 遺伝子の変異は卵巣顆粒膜細胞腫の 90% に見られることからこの腫瘍の発生に関与していると考えてよいか等 10 項目、第二副査の杉浦教授からは卵巣腫瘍の治療方針について等 2 項目の質問があり、これらに対して適切な回答が得られた。従って、学位申請者は学位論文について十分理解しているとともに、産婦人科学に関する知識を有していると考えられた。本研究は、日本人の顆粒膜細胞腫における FoxL2 遺伝子の変異を解析し、日本人においても成人型顆粒膜細胞腫の発症に関わっていることを報告したもので、意義のある研究と言える。以上を持って本論文の著者は博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 中西 真 副査 高橋 智 杉浦真弓